ÜBER LYMPHOZYTENANTIGENE BEIM SCHAF

Jörg Förschner

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551905_0056

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München
Leitung: Professor Dr. Dr.h.c. A. Mayr
und dem Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung der Tierzuchtforschung e.V. München
Wissenschaftlicher Leiter: Professor Dr. Dr.h.c. A. Mayr

ÜBER LYMPHOZYTENANTIGENE BEIM SCHAF

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
JÖRG FÖRSCHNER
aus
Möttingen

München 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. D. O. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. P. Walter

Tag der Promotion: 21. Februar 1975

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Lymphozytenantigene beim Schaf	3
2.2. Leukozytenisolierung	3
2.3. Morphologie der isolierten Lymphozyten und ihre Beurteilung	7
2.4. Immunisierungsverfahren	9
2.5. Methoden zum Nachweis von Isoimmunantikörpern	9
2.5.1. Agglutinationstest	9
2.5.2. Zytotoxischer Test	10
2.6. Absorption	11
3. Eigene Untersuchungen	13
3.1. Material und Methodik	13
3.1.1. Versuchstiere	13
3.1.2. Zellisolierung aus peripherem Blut	14
3.1.3. Lymphozytenisolierung aus Lymphknoten	18
3.1.4. Gewinnung von Antilymphozytenseren	19
3.1.4.1. Immunisierung	19
3.1.4.2. Gewinnung der Isoimmunseren	20

Seite

3.1.5. Absorption zur Fraktionierung der Immunseren 21
3.1.6. Serologische Untersuchungsmethoden 22

4. Ergebnisse 25
4.1. Ergebnisse der Immunisierung 25
4.2. Fraktionierung der Immunseren 28

5. Besprechung der Ergebnisse 32

6. Zusammenfassung und Summary 47/48

7. Literaturverzeichnis 49

1. Einleitung

Nachdem Virchow als einer der ersten auf die Funktion der Lymphozyten bei der Abwehrreaktion des Körpers hingewiesen hatte, haben Untersuchungen der letzten zehn Jahre klar erkennen lassen, welche große Bedeutung den Lymphozyten bei immunologischen Reaktionen, wie sie beispielsweise bei der Organtransplantation, den Autoaggressionskrankheiten und der Allergie auftreten, als immunkompetenten Zellen zukommt.

Die Lymphozyten können nicht nur eine Reaktion auslösen, die eventuell zur Abstoßung fremder Transplantate führt, sondern sind auch in der Lage, zirkulierende Antikörper zu produzieren (GOWANS 1974).

Durch die Arbeiten von MILLER (1974) wissen wir, daß die Reaktion gegen Transplantationsantigene einerseits und die Antikörperbildung andererseits von zwei verschiedenen Klassen von Lymphozyten erfolgt, den T- und B-Lymphozyten.

Die Organtransplantation beim Menschen hat schwerwiegende immunologische Probleme aufgeworfen. Es liegt nahe, eine Klärung zunächst am Versuchstiermodell zu versuchen. Eine der Voraussetzungen für eine Lösung der immunologischen Problematik im Tierversuch ist die Analyse der Antigenstruktur der Lymphozyten bei diesen Versuchstieren.

Neben Hund und Schwein gewinnt das Schaf in der experimentellen Chirurgie und Immunologie als Versuchstier zunehmend an Bedeutung.

Die Notwendigkeit zur Erforschung von Leukozytenantigenen bei unseren landwirtschaftlichen Nutztieren ergibt sich außerdem schon allein daraus, daß es bei kleinen Laboratoriumstieren gelungen ist, Kopplungsbeziehungen zwischen den die Immunitätsbildung kontrollierenden Ir-Genen und den Histokompatibilitätsgenen, die wesentlich an der Kontrolle der Leukozytenantigene beteiligt sind, nachzuweisen (GREEN 1974; KLEIN 1974). Ein Nachweis derartiger, für die Resistenzzucht möglicherweise entscheidender Markerfunktionen der Leukozytenantigene steht bei unseren landwirtschaftlichen Nutztieren noch aus.

Im Augenblick beschränken sich unsere Kenntnisse bei diesen Tieren im wesentlichen darauf, daß wir bei Schwein und Rind serologisch jeweils verschiedene Lymphozyten- und Granulozytenantigene unterscheiden können (VAIMAN et al. 1970; SIMON u. HRUBAN 1971; VIZA, SUGAR u. BINNS 1970; SCHMID u. OTTO 1971; SCHMID, OTTO u. CWIK 1972; VAIMAN et al. 1972; VAIMAN, HAAG, ARNOUX u. NIZZA 1973; VAIMAN 1974).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Serologie von Leukozytenantigenen beim Schaf zu leisten.

2. Literaturübersicht

2.1. Lymphozytenantigene beim Schaf

Über zwei Lymphozytenantigene beim Schaf OL-A und OL-B berichtete MILLOT (1971, 1972). Der Nachweis dieser Lymphozytenantigene wurde mit zytolytischen Isoimmunseren geführt.

2.2. Leukozytenisolierung

Ziel einer Leukozytenisolierung ist die Gewinnung einer Leukozytensuspension, die vollkommen frei von Erythrozyten und Thrombozyten ist. Durch eine Hämolyse mit hypotonischen Lösungen werden die Erythrozyten zwar aufgelöst (FALLON, FREI, DAVIDSON, TRIER u. BURK 1962), eine Abtrennung des Erythrozytenstromas von den Leukozyten gelingt mit diesem Verfahren jedoch nicht. Dies kann nur durch wiederholte Waschvorgänge mit anschließender Zentrifugation erreicht werden.

OTTO u. SCHMID (1970) wiesen darauf hin, daß eine Immunisierung mit einer durch Erythrozytenstroma verunreinigten Leukozytensuspension neben der Bildung von antileukozytären Antikörpern auch zur Bildung von antierythrozytären Antikörpern führt, da das Erythrozytenstroma Träger von erythrozytären Blutgruppenantigenen ist (SCHMID 1961). Es ist für blutgruppenserologische Untersuchungen an Leukozyten also notwendig, eine stromafreie Leukozytensuspension zu gewinnen.

a) Leukozytenisolierung durch Zentrifugation

Eine vollständige Leukozytenisolierung durch Zentrifugation des stabilisierten Blutes im Hämatokrit ist beim Schaf nicht möglich.

b) Leukozytenisolierung durch Sedimentation

Beim Menschen und bei einigen Haustieren (Schwein, Pferd, Hund) erfolgt eine Spontansedimentation der Erythrozyten in einer Dextranlösung, die durch Zugabe von Methylzellulose verstärkt werden kann (FALLON, FREI, DAVIDSON, TRIER u. BURK 1962; OTTO 1970; HARRIS u. UKAEJIOFO 1970; BØYUM 1974). Die Leukozyten verbleiben nach Sedimentation der Erythrozyten im Überstand.

Bei Schaf und Rind, deren Erythrozyten außerordentlich langsam sedimentieren, ist dieses Verfahren zur Isolierung von Leukozyten nicht anwendbar. DAIN u. HALL (1967) führten dies auf einen zu geringen Größenunterschied von Lymphozyten und Erythrozyten im Schafblut zurück. Für die Erythrozyten des Schafes ermittelten sie eine Größe von 4,5 bis 5 µ. Die Leukozyten sind nach SCHEUNERT u. TRAUTMANN (1965) 6,5 µ groß.

UHLENBRUCK (1971) wies darauf hin, daß für die Sedimentation der Erythrozyten nicht nur Ladungsverhältnisse der Membran, sondern auch das durch sie mitbestimmte Zetapotential verantwortlich ist.

c) Leukozytenisolierung durch Hämolyse

Eine Methode zur Isolierung der Leukozyten aus dem Blut von Schafen mit Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration wurde von DAIN u. HALL (1967) beschrieben. Durch kurzzeitige Senkung der Konzentration einer physiologischen NaCl-Lösung erfolgte eine Lyse der Erythrozyten ohne Schädigung der Leukozyten.

Auf der Suche nach Medien, die zur Leukozytenisolierung geeignet sind, wurden solche Substanzen ausgewählt, die wasserunlöslich und nicht hämolytisch wirksam waren. Das spezifische Gewicht sollte zwischen dem der Leukozyten und dem der Erythrozyten liegen. Mit einem Gemisch aus Phthalsäurediäthylester und Phthalsäuredibutylester gelang KELLNER (1953) eine Anreicherung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut. BØYUM (1964) sowie KISSMEYER-NIELSEN u. KJERBYE (1967) schufen mit der Verwendung des hochmolekularen Polysaccharids "Ficoll" in Kombination mit dem Röntgenkontrastmittel "Isopaque" (3 Acetamido-2,4,6,trijod-5-N-methyl-acetamido-benzoat) die Grundlagen für eine befriedigende Methode für die Leukozytenisolierung, besonders zur Trennung von Lymphozyten und Granulozyten.

Das von OTTO u. SCHMID (1970) und OTTO (1970) zur Isolierung von Lymphozyten bzw. von Granulozyten bei Mensch und Tier empfohlene Röntgenkontrastmittel "Uromiro" (Dr. F. Köhler Chemie, Alsbach) ist ein Kombinations-

präparat, das auf der Grundlage von Jodamid aufgebaut ist. Es liegt im Handel als "Uromiro 380" vor und ist eine 80 %ige wässrige Lösung des Methylglukaminsalzes der Acetylaminomethylacetylaminotrijodbenzoesäure mit einem Jodgehalt von 380 mg/ml.

Zur Isolierung der Granulozyten bietet sich die Fähigkeit dieser Zellart zur Phagozytose an. Granulozyten phagozytieren Eisencarbonyl, das ungerinnbar gemachtem Blut zugesetzt wird, und sedimentieren infolge der Vergrößerung ihres Gewichtes; die Leukozyten verbleiben im Überstand (TILZ, SAILER u. HESCHL 1969).

Granulozyten, die Eisenpartikel phagozytiert haben, können auch mit Hilfe von Elektromagneten isoliert werden (LEVINE 1956; PEDERSEN u. HAYHOE 1971).

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von Granulozyten wurde von CASSEN, HILT u. HAYS (1958) und von CARSTAIRS (1962) beschrieben. Sie gewannen die eisenphagozytierenden Zellen durch Zentrifugation.

Es können, bedingt durch die Haftfähigkeit der Granulozyten, auch solche Materialien zur Isolierung benutzt werden, an deren Oberfläche die Granulozyten haften. FICHTELIUS (1951) berichtete über die Verwendung von Papier, TERASAKI, CANNON u. LONGMIRE (1959) benutzten Glas. JOHNSON u. GARVIN (1959) und RABINOWITZ (1964) arbeiteten mit Glaswolle, AMOS (1966)

VALLEE, HUGHES u. GIBSON (1947), ROGENTINE (1969), ENGELFRIET, VAN DER WEERDT u. VENHOVEN (1969), DAUSSET (1969) und WALFORD (1969) verwendeten Nylongewebe; LAMVIK (1966) empfahl Baumwolle.

Die Isolierung von Granulozyten ist auch nach der von BØYUM (1964) und KISSMEYER- NIELSEN u. KJERBYE (1967) beschriebenen Methode möglich, die auf der Dichte-Gradienten-Zentrifugation beruht. Die dabei verwendeten Substanzen "Ficoll" und Isopaque" haben ein spezifisches Gewicht, das zwischen dem der Lymphozyten und dem der Granulozyten liegt. OTTO u. SCHMID (1970) verwendeten das Röntgenkontrastmittel "Uromiro" als Mittel zur Trennung von Lymphozyten und Granulozyten. Nach Zentrifugation im Uromiro-Gradienten lagern sich die Granulozyten im Sediment ab.

2.3. Morphologie der isolierten Lymphozyten und ihre Beurteilung

Während der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellfraktionierung im Uromiro-Gradienten wurden im gefärbten Ausstrichpräparat neben normal konfigurierten Lymphozyten auch Zellformen mit Kernfragmenten gefunden. Aufgrund ihrer Größe und der Anfärbung des Zytoplasmas waren diese Zellen eindeutig den Lymphozyten zuzuordnen.

Vergleichbare, in ihrer Morphologie von der Norm abweichende Lymphozyten haben NORBERG (1970) und NORBERG u. UDDMANN (1973) nach Oxalatbehandlung beschrieben. Es handelte

sich dabei um eine radiale Segmentierung der Lymphozyten (SØDERSTRØM 1966).

DACIE u. LEWIS (1963) machten auf Abbauformen der atypischen Zellen im für das Differentialblutbild angefärbten Ausstrich aus EDTA-Blut aufmerksam. Über kleeblattförmige Lymphozyten berichteten HADLEY u. LARSON (1953) nach Stabilisierung von Blut mit dem Antikoagulans "Sequestrene" nach drei bis sechs Stunden. Sie beobachteten starke Veränderungen in Form von kleinen Vakuolen im Zytoplasma und Lappung der Kerne.

Diese morphologischen Veränderungen, die offensichtlich bei der Behandlung mit einer ganzen Reihe chemischer Substanzen auftreten, müssen deshalb bei der Beurteilung beachtet werden.

SCHRÖDER (1973) und HAUSWALD u. SCHRÖDER (1973) machten die bedeutsame Feststellung, daß sich bereits nach drei Stunden die Morphologie der Lymphozyten im mit EDTA stabilisierten Blut verändern kann. Es kommt zu einer Segmentierung der Lymphozytenkerne mit Bildung von Schmetterlings- und Kleeblattformen.

Nach der Trennung im Uromiro-Gradienten kam es nichtnur zu Veränderungen der Morphologie, sondern auch zu Veränderungen in der Anfärbung des Plasmas.

In der hämatologischen Literatur waren keine Hinweise für eine Veränderung der Anfärbbarkeit von Lymphozyten nach der Isolierung aus peripherem Blut zu finden (HEILMEYER u. BEGEMANN 1955; HEILMEYER u. HITTMAIR 1957; NOWELL 1960; FORTEZZA 1964; ELVES 1966; WINTROBE 1968; BEGEMANN u. RASTETTER 1972; MENGEL, FREI, u. NACHMANN 1972; BEGEMANN u. HARWERTH 1974).

2.4. Immunisierungsverfahren

Als Richtlinien für die Immunisierung dienten die Angaben von SCHMID (1966), der verschiedene Tierarten sechsmal in wöchentlichen Abständen intramuskulär mit einer Einzeldosis von $1,2 \times 10^8$ Lymphozyten immunisierte.

2.5. Methoden zum Nachweis von Isoimmunantikörpern

Zum Nachweis agglutinierender und zytotoxischer Antikörper wurden in der Literatur folgende Methoden beschrieben:

2.5.1. Agglutinationstest

Mit diesem Test werden Antikörper, die die Fähigkeit besitzen, korrespondierende Antigene zu agglutinieren, nachgewiesen. Die Agglutinationsreaktion wird mikroskopisch beurteilt.

2.5.2. Zytotoxischer Test

Durch die Reaktion zytotoxischer Antikörper mit korrespondierenden Antigenen der Lymphozytenmembran wird bei Komplementbindung die Schrankenfunktion der Zellmembran zerstört. Diese Reaktion wird durch einen Farbausschlußtest nachgewiesen. Toxisch geschädigte Zellen nehmen die Farbstoffe Trypanblau bzw. Eosin auf, während die Membran vitaler Zellen für diese Farbstoffe undurchlässig ist.

Ein Nachweis zytotoxischer Antikörper ist sowohl im Makro- als auch im Mikrotest durchführbar. Beide Methoden beruhen auf demselben Prinzip und unterscheiden sich lediglich in der Menge des Versuchsansatzes.

Über den Makrotest wurde durch ENGELFRIET u. BRITTEN (1965) und von WALFORD, GALLAGHER u. TROUP (1965) berichtet.

Der Mikrotest wurde durch TERASAKI u. Mc CLELLAND (1964) eingeführt. Zum Test wurden mit Mineralöl gefüllte Mikrotestkammern verwendet, um die Verdunstung der geringen Mengen des Versuchsansatzes während der Inkubationszeit zu verhindern.

Die Beurteilung der zytotoxischen Reaktionen erfolgte mit dem umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop, wobei der Prozentsatz der gefärbten und damit geschädigten Zellen beurteilt wurde.

Verschiedene Modifikationen bezüglich der verwendeten Serummengen, der Bebrütungsdauer, der Bebrütungstemperatur, des Komplementzusatzes und der Farbindikatoren im zytotoxischen Test wurden beschrieben (TERASAKI u. Mc CLELLAND 1964; WALFORD, GALLAGHER u. TROUP 1965; KISSMEYER- NIELSEN u. KJERBYE 1967; TROUP u. WALFORD 1969; Manual of Tissue Typing Techniques 1970; ALBERT 1973; und SIRCHIA et al. (1973).

2.6. Absorption

Ziel der Absorption ist es, aus den gewonnenen, meist polyvalenten Immunseren monovalente Testseren herzustellen, die nur einzelne Antigene erfassen. Polyvalente Immunseren enthalten mehrere Antikörperpopulationen, die gegen verschiedene Antigene gerichtet sind. Durch Absorption können bestimmte Antikörperpopulationen in derartigen Immunseren durch Zellen, die Träger der korrespondierenden Antigene sind, gezielt entfernt werden.

Die Absorption eines Immunserums mit Leukozyten ist im Vergleich zur Absorption mit Erythrozyten viel schwieriger und zeitraubender, da häufig eine wiederholte Absorption erforderlich ist, um ein monovalentes Serum herzustellen (SCHMID 1972).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über die Technik der Absorption; die Unterschiede beziehen sich

hauptsächlich auf Titer, die zur Absorption erforderliche optimale Zellzahl, sowie auf die Bebrütungsdauer und die Bebrütungstemperatur (KISSMEYER-NIELSEN u. KJERBYE 1967; MARSMANN, VAN DER HART u. VAN LOGHEM 1970; SCHMID, OTTO u. CWIK 1972; IHA, GERBRANDT, BODMER, MC GARY u. STONE 1973; BALNER, GABB, TOTH, DERSJANT u. VAN VREESWIJK 1973).

Über Absorptionen mit Lymphozyten, die aus Lymphknoten von Schweinen gewonnen worden waren, berichteten SIMON u. HRUBAN (1971).

Die Absorption von Antilymphozytenseren wurde auch mit Thrombozyten durchgeführt (VAIMAN , GARNIER, KUNLIN, HAY, PARC, BACOUR, FAGNIEZ, VILLIERS, LECOINTRE, BARA, NIZZA 1972; MITTAL u. TERASAKI 1972). DORF, TOTH u. BALNER (1972) wiesen besonders auf das Verhältnis von Antikörpertiter und eingesetzter Zellmenge hin.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methodik

3.1.1. Versuchstiere

Zur Immunisierung stand eine Schafherde des staatlichen Versuchsgutes Neuhof zur Verfügung. In der ersten Immunisierungsreihe wurden 35 Tiere immunisiert. 32 Tiere waren Merino-Landschafe, bei den anderen drei Tieren handelte es sich um Texel-Schafe. Zwölf Schafe dienten als Donoren für die Gewinnung der Zellen, mit denen die 35 Rezipienten immunisiert wurden. Um das Antigenspektrum bei der Immunisierung möglichst eng zu halten, wurden als Donoren solche Tiere ausgewählt, die mit den Rezipienten verwandt waren. Aus diesem Grunde wurden nach Möglichkeit die Mütter mit den Zellen der Töchter immunisiert.

Nach sechs Monaten wurden mit den Zellen von sieben Donoren aus der ersten Versuchsreihe zehn Rezipienten reimmunisiert. Mit den Zellen der gleichen Donoren wurde zum Zeitpunkt der Reimmunisierung außerdem eine zweite Immunisierungsserie durchgeführt. Als Rezipienten hierfür dienten zehn nicht verwandte Merino-Landschafe.

Zur Prüfung der Immunseren auf Antikörper wurden Lymphozyten von 100 geschlachteten Schafen verwendet. Für die weitergehenden Untersuchungen wurden zwölf Schaffamilien mit ins-

gesamt 120 Tieren zum Test herangezogen. Bei acht Gruppen handelte es sich um vollständige Familien, bei den übrigen vier Gruppen standen jeweils nur ein Elternteil und die Nachkommen für die Untersuchung zur Verfügung. Von fünf Tieren einer Familie wurden die Lymphozyten zur Absorption einer Auswahl von zehn Immunseren verwendet und die so absorbierten Seren erneut gegen Lymphozyten von 80 weiteren Schafen getestet. Darunter befanden sich vier Familien, die vor und nach der Absorption getestet worden waren. Alle übrigen Schafe waren Schlachthoftiere und Tiere aus Zuchtbetrieben. Für die zweite Absorption wurden dann Lymphozyten aus Lymphknoten von neun geschlachteten Schafen verwendet. Die damit absorbierten Seren wurden gegen Lymphozyten von insgesamt 146 Schafen getestet. Im einzelnen handelte es sich dabei um 60 nicht verwandte Schlachtschafe, sechs Mutter-Tochter-Paare, sowie sechs Schaffamilien, bestehend aus sechs Böcken, 42 Lämmern mit dazugehörigen Mutterschafen. Unter den Lämmern befanden sich vier Zwillingspaare. Die Untersuchungen von Lymphozyten aus geschlachteten Schafen wurden mit Lymphozyten aus Lymphknoten durchgeführt, während für die Untersuchungen an Schaffamilien aus Zuchtbeständen Lymphozyten aus peripherem Blut verwendet wurden.

3.1.2. Zellisolierung aus peripherem Blut

Zur Leukozytenisolierung wurden je nach dem Verwendungszweck und der dazu benötigten Blutmenge zwei verschiedene Methoden gewählt:

Für die Leukozytentypisierung mit den Immunseren hat sich eine Blutmenge von 5 ml als ausreichend erwiesen. Das Blut wurde im Verhältnis 4 : 1 mit einem Stabilisator folgender Zusammensetzung ungerinnbar gemacht:

Natriumchlorid	2,5 g
Natriumcitrat	30,0 g
Natriumcyanid	0,2 g
Streptomycin	0,5 g
aqua dest. ad	1000,0

Das stabilisierte Blut wurde auf Uromiro überschichtet und zentrifugiert. Die Erythrozyten und die Granulozyten bildeten, entsprechend ihrem spezifischen Gewicht das Sediment, die Lymphozyten zusammen mit den Thrombozyten einen weißen Ring, der sich im Überstand zwischen dem Uromirogradienten und dem Plasma befand.

Im einzelnen wurde die Isolierung in folgender Weise durchgeführt:

1. 5 ml stabilisiertes Blut wurden in einem Gradienten über 5 ml Uromiro 380*, das zuvor mit aqua dest. auf ein spezifisches Gewicht von 1.076 eingestellt worden war, überschichtet und 60 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte eine differenzierte Zellanreicherung im Reagenzglas.

---

* Bezugsquelle: Dr. Franz Köhler Chemie, 6146 Alsbach, Bergstraße

Der Uromiro-Gradient trennt grundsätzlich Lymphozyten und Thrombozyten, die sich im Reagenzglas als deutlicher weißer Ring zwischen dem Plasma und dem Gradienten anreichern, von dem Sediment, das aus Granulozyten und Erythrozyten besteht.

2. Der aus Lymphozyten und Thrombozyten bestehende Ring wurde abgezogen und die Zellen in 10 ml physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und zehn Minuten lang bei 400 g zentrifugiert. Zur Entfernung der Thrombozyten und des Uromiro wurde dieser Waschvorgang noch dreimal wiederholt. Eine Zentrifugation bei dieser g-Zahl führte zu einer Sedimentation der Lymphozyten. Der thrombozytenreiche Überstand wurde verworfen.

3. Zur Entfernung restlicher Erythrozyten aus der Lymphozytensuspension wurde 0,85 %ige wässrige Ammoniumchloridlösung im Verhältnis von 1 : 10 zugesetzt und zehn Minuten lang hämolysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 200 g 15 Minuten lang zentrifugiert.

4. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurden die so gewonnenen Lymphozyten zweimal gewaschen.

Diese Lymphozyten wurden nach Resuspension in physiologischer NaCl-Lösung in einer Konzentration von 4000 mm^3 zur Typisierung verwendet.

Zur Herstellung von Leukozytenpräparationen mit hohen Zellzahlen, die für die Immunisierung und die Absorption erforderlich sind, mußten größere Mengen Blut verarbeitet werden. Mit folgender Methode war es möglich, bis zu 1 Liter Blut pro Tier zu verarbeiten.

1. Stabilisiertes Blut wurde in Portionen von 200 ml mit 20 ml physiologischer NaCl-Lösung versetzt und zehn Minuten bei 300 g in einer Stock-Zentrifuge, Größe 6 x 250, zentrifugiert.

2. Das überstehende, thrombozytenreiche Plasma wurde abgezogen und 25 Minuten in derselben Zentrifuge bei 2900 g zentrifugiert. Daraus wurden die Thrombozyten für die Immunisierung gewonnen. Als Einzeldosis für die Immunisierung wurden 5×10^{11} Thrombozyten abgefüllt und bei $- 20^{\circ}$ C eingefroren.

3. Auf dem Erythrozytensediment reicherten sich die Lymphozyten und Granulozyten als weiße Schicht an. Diese Schicht wurde mit der obersten Erythrozytenschicht abgezogen und zur Hämolyse in einer 0,85 %igen NH_4Cl-Lösung im Verhältnis 1 : 20 resuspendiert.

4. Nach dieser Hämolyse wurde die Suspension fünf Minuten lang in einer Hettich-Zentrifuge Modell Rotixa bei 200 g zentrifugiert.

5. Wenn nach einer einmaligen Hämolyse nicht alle Erythrozyten aufgelöst waren, wurde eine zweite Hämolyse angeschlossen.

6. Das Sediment, bestehend aus Lymphozyten und Granulozyten, wurde in 15 ml physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert, auf 25 ml des Uromiro-Gradienten überschichtet und 30 Minuten bei 400 g zentrifugiert.

7. Die Lymphozyten bildeten einen weißen Ring; die Granulozyten sedimentierten.

8. Die so gewonnenen Zellpopulationen wurden gewaschen, in der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt, auf eine Dichte von $1,5 \times 10^9$ pro Injektionsportion eingestellt und bei -20° C tiefgefroren.

3.1.3. Lymphozytenisolierung aus Lymphknoten

Die Lymphozyten aus Lymphknoten wurden nach folgendem Verfahren gewonnen:

Mesenterial-Lymphknoten wurden von Schafen unmittelbar nach der Schlachtung entnommen und in frischem Zustand im Labor in kleine Stücke zerschnitten. Diese Stücke wurden durch ein feinmaschiges Stahlsieb der Maschengröße 0,5 mm, das mit physiologischer NaCl-Lösung angefeuchtet war, gerieben. Die physiologische NaCl-Lösung

mit den ausgeschwemmten Lymphozyten wurde mit einer Pipette in Reagenzgläser gefüllt und mit physiologischer NaCl-Lösung zehn Minuten bei 400 g ausgewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das resuspendierte Sediment durch Überschichtung auf den Uromiro-Gradienten im Verhältnis 1 : 1 getrennt.

Nach einer Zentrifugation von 30 Minuten bei 400 g reicherten sich die Lymphozyten als weißer Ring an. Dieser Ring wurde abgezogen und in physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen.

3.1.4. Gewinnung von Antilymphozytenseren

3.1.4.1. Immunisierung

Von jedem Schaf, das als Zelldonor eingesetzt wurde, wurden aus der V. jugularis 800 ml Blut entnommen und durch Zusatz von 200 ml Stabilisator ungerinnbar gemacht. Weil Schafblut sehr starke Gerinnungstendenz zeigte, war eine Zugabe des Stabilisators im Verhältnis 1 : 4 erforderlich. Aus den Blutproben wurden Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten isoliert und in je sechs Portionen aufgeteilt. Zur Vermeidung eines Zellverlustes war es unumgänglich, die Zellen am selben Tag, an dem auch das Blut entnommen wurde, zu isolieren.

Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden in der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt und im gefärbten Ausstrichpräparat auf ihre Reinheit hin geprüft. Bis zu ihrer Verwendung für die Immunisierung wurden sie bei - 20° C aufbewahrt.

Zur Gewinnung von Antilymphozytenseren wurden 35 Tiere isoimmunisiert. Die Immunisierung erfolgte jeweils sechsmal in wöchentlichen Abständen durch intramuskuläre Injektionen im Glutealbereich. Soweit möglich, wurden die Mütter mit den Zellen ihrer Töchter immunisiert. Als Immunisierungsmaterial wurden Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten verwendet. Die Immunisierungsdosis pro Injektion betrug $1,5 \times 10^9$ Lymphozyten, bzw. $1,5 \times 10^9$ Granulozyten, bzw. 5×10^{11} Thrombozyten. Die Immunisierungen wurden von den Schafen reaktionslos vertragen. Sechs Monate nach der letzten Immunisierung wurden von den 35 Schafen zehn Schafe dreimal in wöchentlichen Abständen mit derselben Zellsuspension und Zellmenge reimmunisiert.

3.1.4.2. Gewinnung der Isoimmunseren

Die Blutentnahme zur Serumgewinnung erfolgte eine Woche nach der letzten Injektion. Von den einzelnen Tieren wurden 450 bis 1000 ml Blut entnommen. Die Serumausbeute war mit 150 bis 350 ml von Tier zu Tier verschieden. Für die Blutentnahme wurden Gefäße verwendet, die nach Retraktion des Blutkuchens in der Stock-Zentrifuge 6 x 250

zentrifugiert werden konnten. Die Blutentnahmen wurden von den Tieren ohne Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes toleriert.

Um eine gute Serumausbeute zu erreichen, wurden die Blutproben über Nacht bei 4° C im Kühlraum aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden sie bei 2700 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Pipetten abgezogen und das Serum anschließend 30 Minuten bei 56° C im Wasserbad inaktiviert. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde das Immunserum im Tiefkühlraum bei - 20° C aufbewahrt.

3.1.5. Absorption zur Fraktionierung der Immunseren

Zur Absorption wurden 0,2 ml Immunserum mit 1×10^{8} Lymphozyten unter mehrmaligem Schütteln 30 Minuten bei 37° C im Brutschrank und anschließend 30 Minuten bei 4° C im Kühlraum inkubiert. Das Serum-Zell-Gemisch wurde dann 15 Minuten bei 3700 g zentrifugiert, und der klare Überstand wurde abgehoben. Die auf diese Weise absorbierten Seren wurden gegenüber den Lymphozyten der Tiere, mit denen absorbiert wurde, getestet, um die Absorptionen auf ihre Vollständigkeit hin zu prüfen.

Bei einer ersten orientierenden Absorptionsserie wurde jedes der zehn unverdünnten Immunseren einzeln mit den Lymphozyten von vier Schafen absorbiert. Alle Seren wurden vor ihrer Verwendung zum Test zur Ausschaltung

des Prozoneneffekts im Verhältnis 1 : 2 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Bei einer zweiten Absorptionsserie wurden sieben ausgewählte Immunseren mit Lymphozyten aus Lymphknoten von neun geschlachteten Schafen absorbiert. Auch diese Seren wurden für den Test mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 2 verdünnt.

3.1.6. Serologische Untersuchungsmethoden

a) Agglutinationstest:

Alle Immunseren wurden auf das Vorhandensein agglutinierender Antikörper untersucht. Dazu wurde zu je einem Tropfen inaktiviertem, mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 2 verdünntem Serum, ein Tropfen einer Zellsuspension einer Dichte von 20.000 Zellen mm^3 gegeben. Der Versuchsansatz wurde zur ausreichenden Vermischung von Zellen und Serum gut geschüttelt und 45 Minuten bei 27° C im Brutschrank bebrütet. Zur Vermeidung einer Aggregation und zur Differenzierung gegenüber spezifischen Agglutinationen bei der Ablesung wurden die Proben vor dem Ablesen nochmals geschüttelt.

Die im Immunserum suspendierten Zellen wurden auf einen Objektträger aufgetragen und die Stärke der Agglutination mikroskopisch in einer 150fachen Vergrößerung beurteilt.

b) Zytotoxischer Test

I. Makrotest

Der Makrotest diente ausschließlich einer orientierenden Voruntersuchung. Eine Mischung, bestehend aus einem Tropfen einer Lymphozytensuspension mit einer Dichte von 4000 Zellen/mm^3 und 0,05 ml Serum, wurde 30 Minuten bei 27° C inkubiert. Anschließend wurden 0,05 ml mit Schaferythrozyten absorbiertes Kaninchenserum als Komplementquelle dazugegeben und die Bebrütung 30 Minuten fortgesetzt. Schließlich wurden noch 0,05 ml einer 1 %igen isotonischen Trypanblaulösung* hinzugefügt und weitere 30 Minuten bei 27°C inkubiert. Zur Auswertung wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen bei einer 400-fachen Vergrößerung im umgekehrten biologischen Mikroskop (Wild-M 40) ermittelt.

II. Mikrotest

Für die Untersuchungen an Schaflymphozyten wurde der Mikrotoxizitätstest nach KISSMEYER-NIELSEN u. KJERBYE (1967) und THORSBY u. KISSMEYER-NIELSEN (1969) in folgender Weise modifiziert:

Ein Mikroliter Serum und ein Mikroliter einer Lymphozytensuspension mit einer Zelldichte von 4000 Zellen mm^3

---

* Fluka Standard trypanbleu, Fluka-catalogue-No 93590, Fluka AG, Chem. Fabrik, CH-9470 Buchs.

wurden in einer mit Decköl* gefüllten Kammer 30 Minuten bei 27° C inkubiert. Nach Zugabe von einem Mikroliter unverdünntem, zuvor mit Schafblut absorbiertem Kaninchenserum als Komplement wurde die Bebrütung bei gleicher Temperatur für weitere 30 Minuten fortgesetzt. Anschließend wurde dem Versuchsansatz ein Mikroliter einer 1 %igen Trypanblaulösung zugefügt und nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten im umgekehrten biologischen Mikroskop der Anteil der gefärbten Zellen ermittelt. Um Fehlerquellen auszuschalten, wurden parallel zu jedem Versuchsansatz serumfreie Kontrollen mit physiologischer NaCl-Lösung angesetzt. Zellschädigungen, die nicht auf Antikörperreaktionen zurückzuführen waren, konnten damit erfaßt werden.

Die Stärke der Reaktion ergab sich aus dem prozentualen Anteil der mit Trypanblau gefärbten Lymphozyten. Dabei wurde folgender Beurteilungsschlüssel zugrunde gelegt:

unter 10 %	= negativ
10 bis 20 %	= 1
20 bis 30 %	= 2
30 bis 50 %	= 3
50 bis 70 %	= 4
über 70 %	= 5

Eine erste Überprüfung der Immunseren auf zytotoxische Antikörper gegenüber Lymphozyten von Schlachtschafen

---

* Biotest-Serum-Institut GmbH, 6 Frankfurt/Main

erfolgte orientierend im Makro-Lymphozyten-Toxizitätstest. Die sich daran anschließenden Untersuchungen auf Antikörper wurden im Mikrozytotoxizitätstest vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Immunisierung

Bei der ersten Immunisierungsreihe wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Von 35 immunisierten Schafen enthielten die Seren von 17 Schafen antilymphozytäre Antikörper gegenüber den Donorlymphozyten. In den Seren von fünf Schafen wurden natürliche zytotoxische Antikörper gefunden, die keine Reaktionen mit den Donorlymphozyten zeigten. Der qualitative und quantitative Antikörpernachweis erfolgte im zytotoxischen Test mit den zur Immunisierung verwendeten Donorlymphozyten. Im einzelnen wurden folgende Tiergruppen immunisiert:

a) Isoimmunisierung mit Lymphozyten

Zwölf Tiere wurden mit Lymphozyten immunisiert; bei sieben Tieren konnten gegen Lymphozyten gerichtete zytotoxische Antikörper nachgewiesen werden. Die Antikörpertiter nach der Erstimmunisierung lagen bei 1 : 2 bis 1 : 8, bei der Reimmunisierung bei 1 : 4 bis 1 : 64.

b) Isoimmunisierung mit Granulozyten

Bei sechs von zwölf mit Granulozyten immunisierten Tieren wurden antilymphozytäre zytotoxische Antikörper gegenüber den Spenderlymphozyten nachgewiesen. Die Antikörpertiter bei der Erstimmunisierung lagen bei 1 : 2 bis 1 : 8; eine Reimmunisierung wurde nicht durchgeführt.

c) Isoimmunisierung mit Thrombozyten

Von elf Schafen, die mit Thrombozyten immunisiert wurden, bildeten vier Tiere antilymphozytäre zytotoxische Antikörper. Die Antikörpertiter lagen nach der Erstimmunisierung bei 1 : 2 bis 1 : 8, nach der Reimmunisierung bei 1 : 4 bis 1 : 64.

Unter den auf ihren Immunisierungserfolg hin untersuchten Tieren befanden sich Schafe, die weder nach der Erstimmunisierung noch nach der Reimmunisierung eine Antikörperbildung zeigten. Bei einem Tier zeigte sich eine Antikörperbildung mit einem Titer von 1 : 4 erst nach der Reimmunisierung. Bei einem weiteren Tier war nach der Erstimmunisierung zunächst ein Antikörpertiter von 1 : 4 nachgewiesen, der sich nach der Reimmunisierung auf 1 : 64 erhöhte.

Unabhängig von den zuvor angegebenen 35 immunisierten Schafen wurde bei zehn weiteren Schafen geprüft, ob bei gleichbleibender Gesamtdosis und gleichbleibendem Immunisierungsintervall von einer Woche, bei nur drei

Immunisierungsdosen Antikörperbildung zustande kommt. Bei diesen Untersuchungen hat sich ergeben, daß von zehn Tieren fünf Tiere Antikörper gebildet hatten. Im einzelnen lagen die lymphozytotoxischen Titer nach der Immunisierung mit Lymphozyten bei 1 : 4 bis 1 : 32, nach der Immunisierung mit Thrombozyten bei 1 : 4 bis 1 : 16.

Die Seren der Tiere, die gegenüber den Spenderzellen ohne Reaktion geblieben waren, wurden ebenfalls auf das Vorhandensein zytotoxischer antilymphozytärer Antikörper getestet. Dabei stellte sich heraus, daß auch bei einigen dieser Tiere zytotoxische Antikörper gegenüber Lymphozytenpräparationen von Schafen nachgewiesen werden konnten.

Alle Immunseren, die aus der ersten Immunisierungsreihe stammten, wurden auf das Vorhandensein agglutinierender Antikörper gegenüber Lymphozyten geprüft. Lymphozytenagglutinine wurden jedoch in keinem Serum gefunden. Aus diesem Grunde wurde auf weitere Agglutinationsuntersuchungen verzichtet.

Bei einem Vergleich der lymphozytotoxischen Reaktionsmuster mit den Reaktionsmustern von 36 monovalenten antierythrozytären Faktorenseren vom Schaf (SCHMID 1971, 1972) in der Hämolyse ergaben sich keine Übereinstimmungen. Eine Ausnahme bildet das R-System des Schafes (SCHMID, CWIK u. FÖRSCHNER 1975; SCHMID u. CWIK 1975).

4.2. Fraktionierung der Immunseren

Bei einem Vergleich aller nicht absorbierten Immunseren in ihrem Reaktionsspektrum gegenüber den Lymphozyten von 100 Schlachtschafen und 120 Schafen aus zehn Familien hat sich ergeben, daß die überwiegende Anzahl von Seren mehrere Antikörperpopulationen enthielt.

Lymphozyten von fünf Schafen einer Familie, die sich als starke Merkmalsträger erwiesen, wurden zu einer orientierenden absorptiven Fraktionierung von zehn ausgewählten Immunseren herangezogen. Die Vollständigkeit der Absorption wurde gegenüber den zur Absorption verwendeten Lymphozyten überprüft.

Diese absorbierten Immunseren wurden zusammen mit allen nicht absorbierten Immunseren gegenüber den Lymphozyten von 40 Schlachtschafen und 38 weiteren Schafen aus fünf Familien in ihren zytolytischen Reaktionsspektren verglichen. Dieser Vergleich zeigte, daß es möglich ist, durch eine Absorption diese, in ihrer Antikörperstruktur komplex aufgebauten Immunseren, zu fraktionieren. Eine Prüfung der Immunseren gegenüber Lymphozyten aus peripherem Blut und Lymphozyten aus Lymphknoten ergab Übereinstimmung in ihren zytotoxischen Reaktionen. Damit wurden mit den zur Verfügung stehenden Immunseren keine Unterschiede in den Antigenen der Blutlymphozyten und Lymphknotenlymphozyten beim Schaf festgestellt.

Aufgrund der Anzahl und der unterschiedlichen Reaktionsmuster der in den einzelnen Immunseren nachgewiesenen Reaktionen wurden sieben Seren zur Absorption ausgewählt, in denen Antikörper zum Nachweis verschiedener Lymphozytenantigene zu vermuten waren.

Jedes der sieben ausgewählten Immunseren wurde einzeln mit den Lymphozyten aller neun Schafe absorbiert. Für diese Absorptionen wurden Lymphozyten verwendet, die aus Lymphknoten von geschlachteten Schafen isoliert worden waren. Damit standen genügend Zellen zur Verfügung, um Absorptionen in größerem Umfang durchführen zu können. Die Vollständigkeit der Absorption wurde gegenüber den zur Absorption verwendeten Zellen überprüft. Sowohl die absorbierten Seren als auch die nicht absorbierten Rohseren, aus denen sie hergestellt worden waren, wurden zur Typisierung der Lymphozyten von 146 Merinoland-Schafen eingesetzt. Bei der Untersuchung der absorbierten Immunseren hat sich ergeben, daß diese Seren unterschiedliche Antikörperpopulationen enthielten.

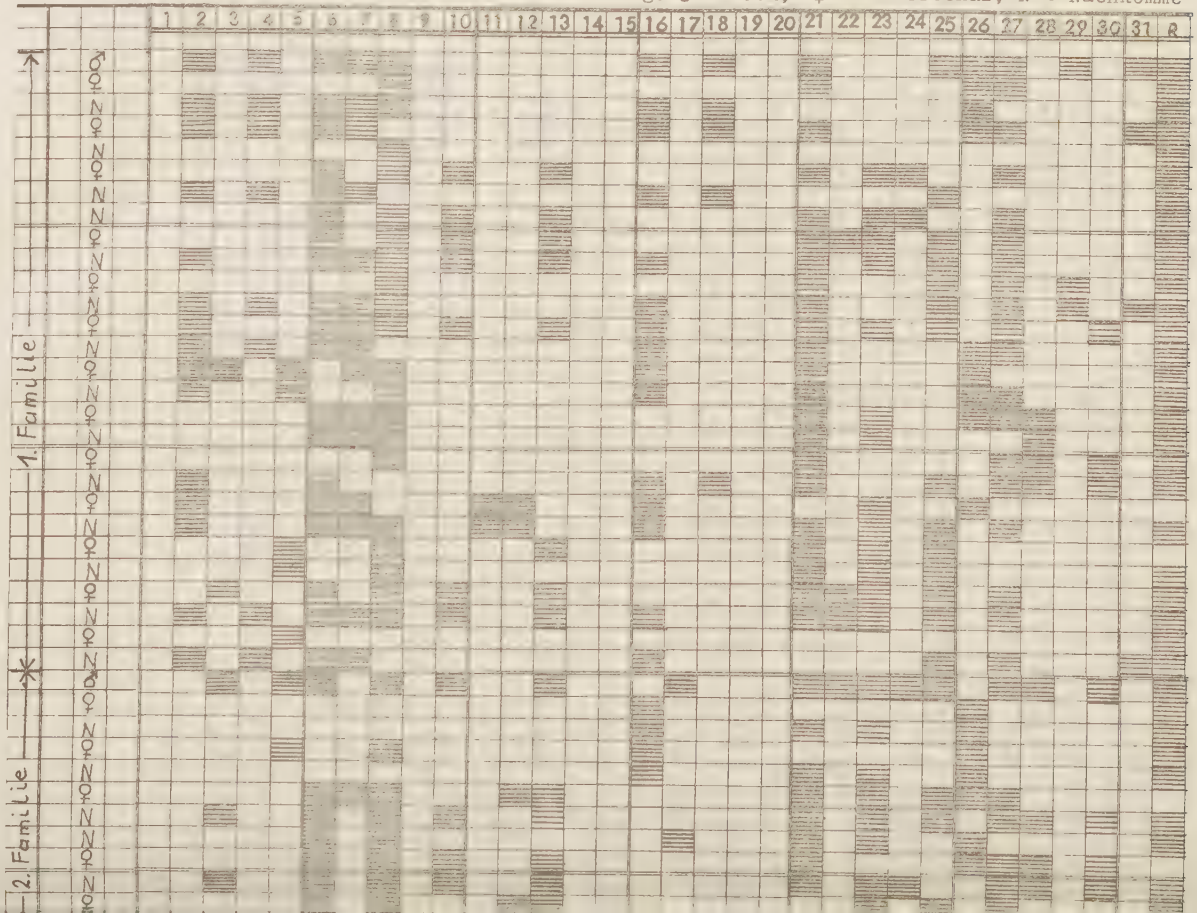
Die zur Absorption verwendeten Lymphozyten der neun Schafe hatten aus den sieben Seren sowohl gleiche als auch unterschiedliche Antikörperpopulationen entfernt, das heißt, daß ein Serum nach Absorption mit den Lymphozyten von neun verschiedenen Tieren sowohl übereinstimmende als auch unterschiedliche Reaktionsmuster aufwies.

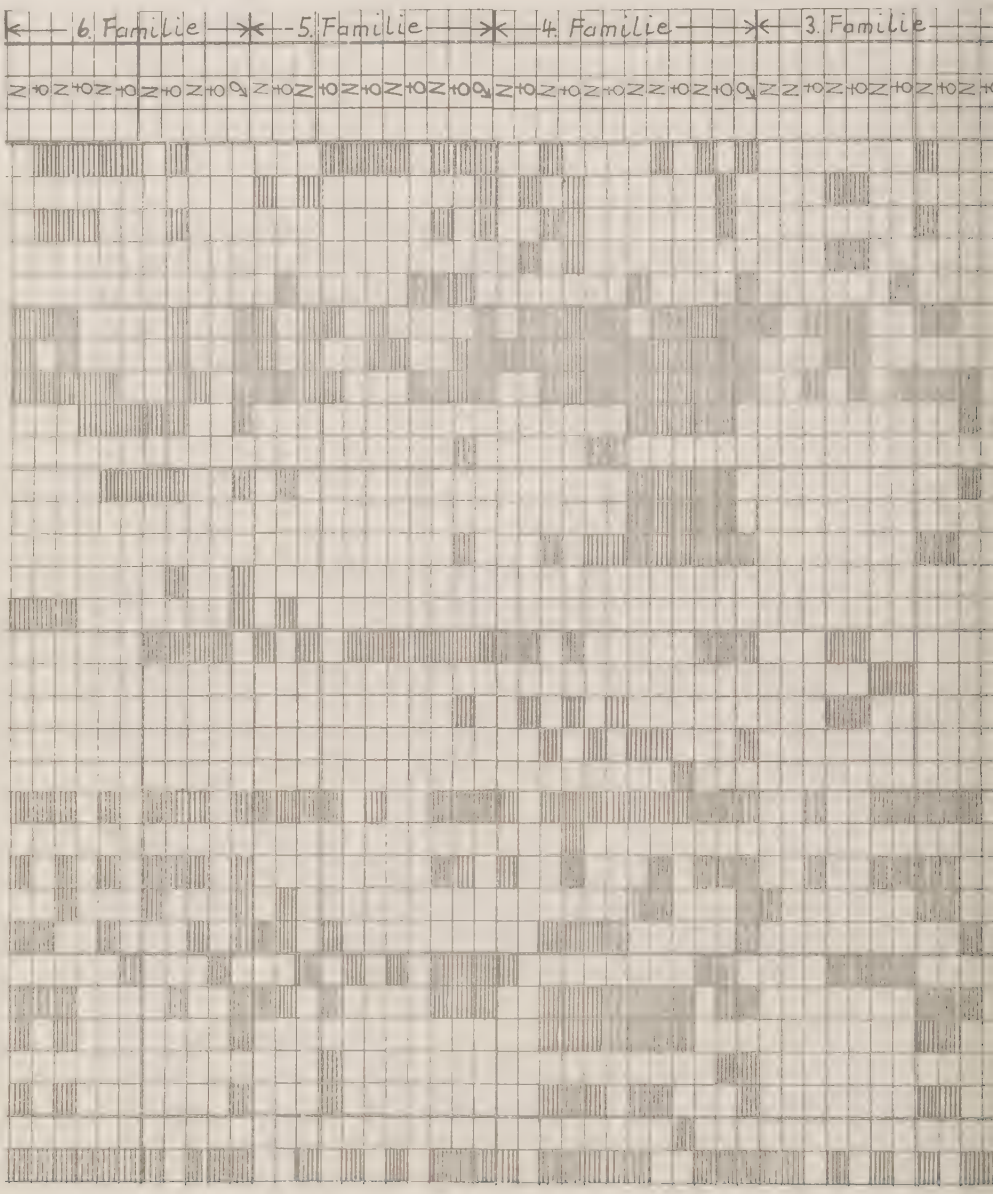
Tabelle 1. Lymphozytenantigene beim Schaf.

Schaf-
familie

Reaktionsmuster

Zeichenerklärung: ♂ = Bock, ♀ = Mutterschaf, N = Nachkomme




6. Familie
5. Familie
4. Familie
3. Familie

Mit den zur Verfügung stehenden Testseren lassen sich folgende 31 verschiedenen Antigenmuster differenzieren. Die Numerierung 1 bis 31 ist eine vorläufige Laborbezeichnung (Tabelle 1).

Eine Auswertung der 31 Reaktionsmuster der einzelnen Tiere ergibt die Möglichkeit der Feststellung des Phänotyps jedes Einzeltieres und der Ermittlung der Phänotypfrequenzen der untersuchten Populationen des Merino-Landschafes (Tabelle 2).

Die Prüfung der absorbierten Immunseren an einem umfangreichen Familienmaterial ergab einen kodominanten, autosomalen Erbgang, der mit diesen Seren nachweisbaren Lymphozytenantigene (siehe Tabelle 1). Die Abstammung der untersuchten Schaffamilien wurde blutgruppenserologisch durch den Nachweis von erythrozytären Blutgruppen sowie durch Transferrin- und Hämoglobinbestimmungen gesichert.

5. Besprechung der Ergebnisse

Zur Klärung der Frage, ob beim Schaf, ähnlich wie beim Menschen und bei kleinen Laboratoriumstieren, auf verschiedenen kernhaltigen Blutzellen die gleichen Antigene nachweisbar sind, wurden die Versuchstiere bei diesen Untersuchungen sowohl mit Lymphozyten als auch mit Granulozyten oder Thrombozyten immunisiert.

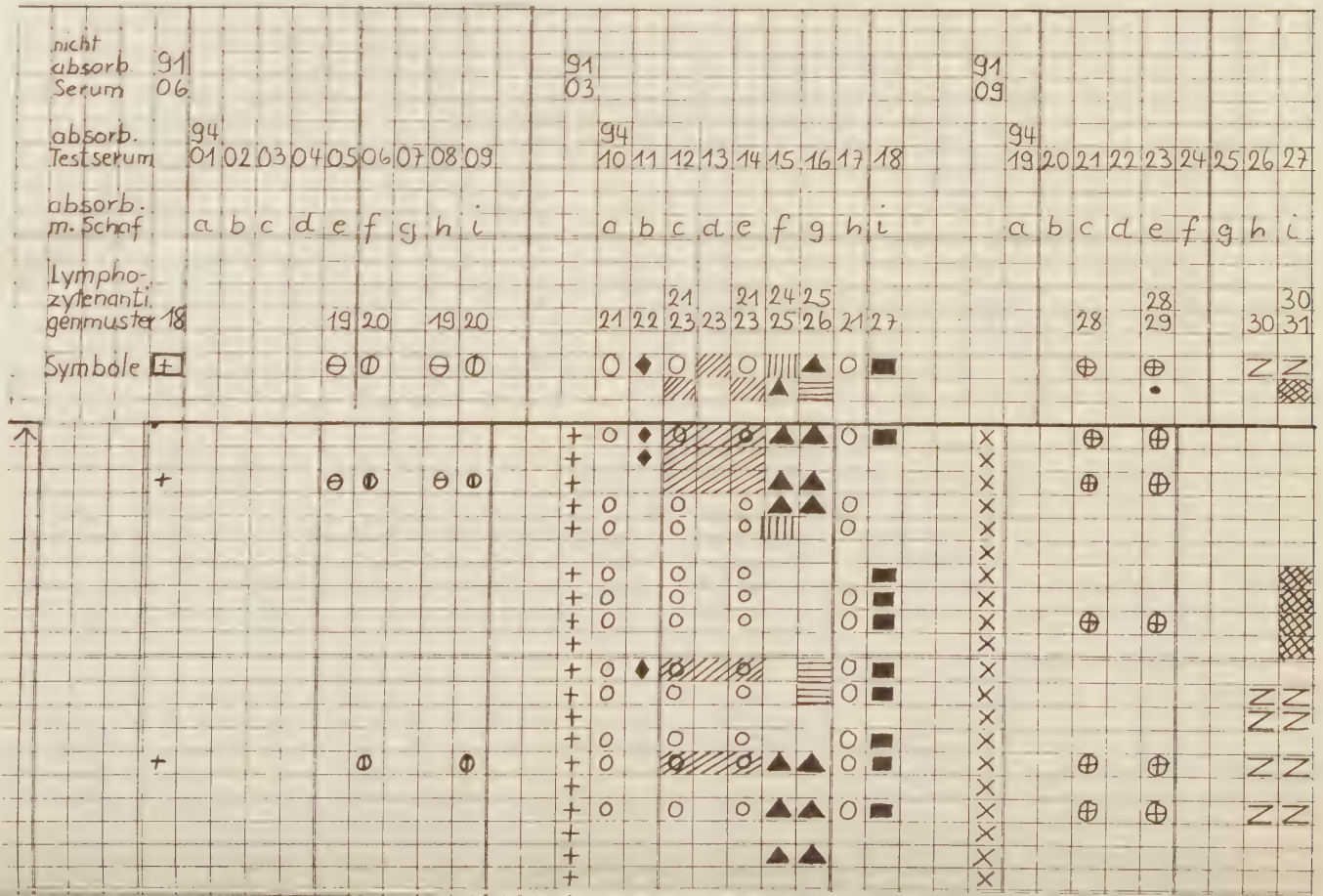
Tabelle 2. Phänotypfrequenzen von Lymphozytenantigenen bei Merino-Landschafen

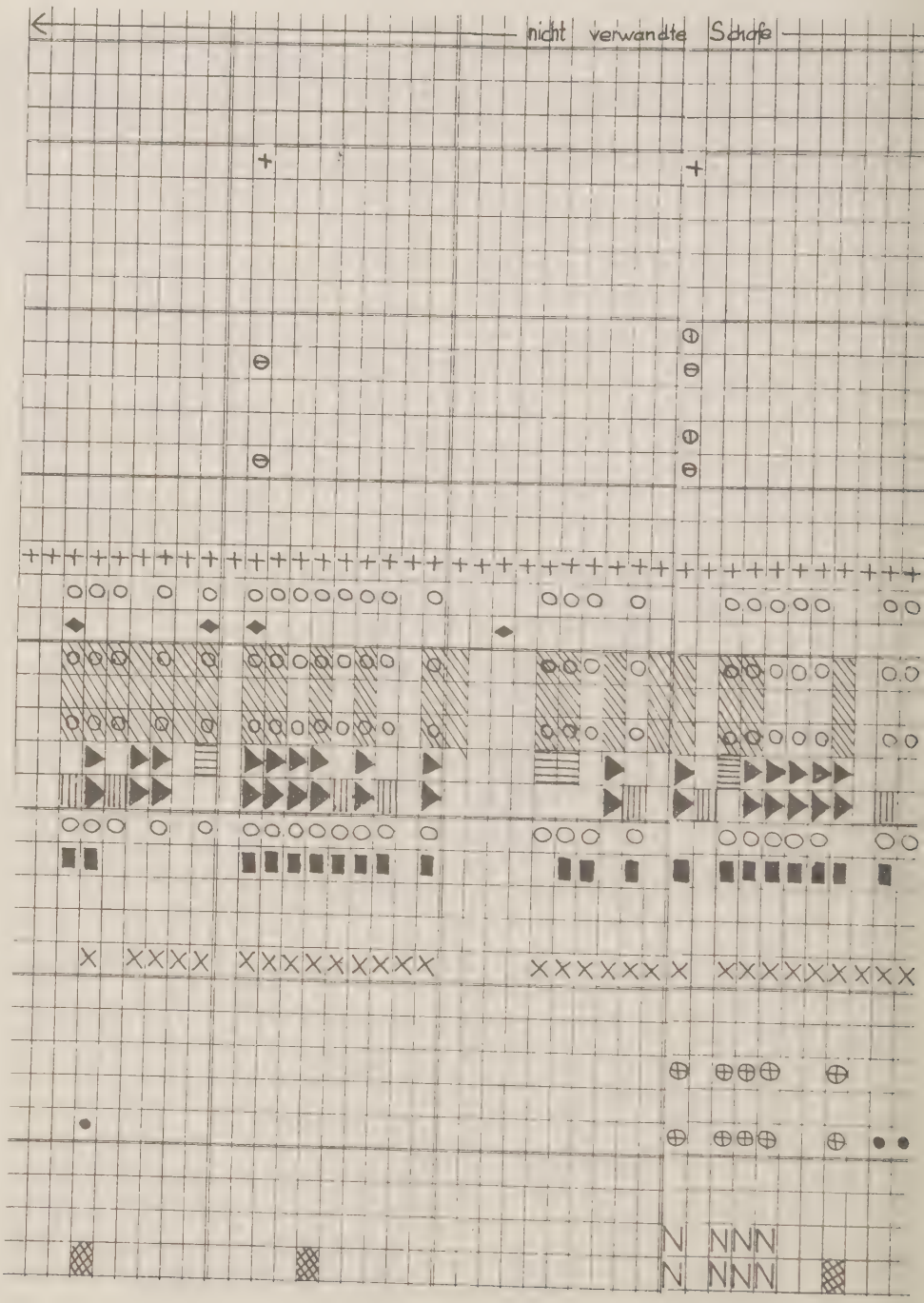
n = 146

Lymphozyten-antigen	Phänotyp-frequenz	Lymphozyten-antigen	Phänotyp-frequenz
1	0.2466	16	0.4178
2	0.1301	17	0.0548
3	0.1507	18	0.0959
4	0.1027	19	0.0479
5	0.1781	20	0.0342
6	0.4384	21	0.7192
7	0.4110	22	0.0890
8	0.7260	23	0.4932
9	0.0959	24	0.1644
10	0.1301	25	0.3973
11	0.1301	26	0.2740
12	0.0890	27	0.5616
13	0.2260	28	0.2055
14	0.0342	29	0.0753
15	0.0753	30	0.1918
		31	0.0822

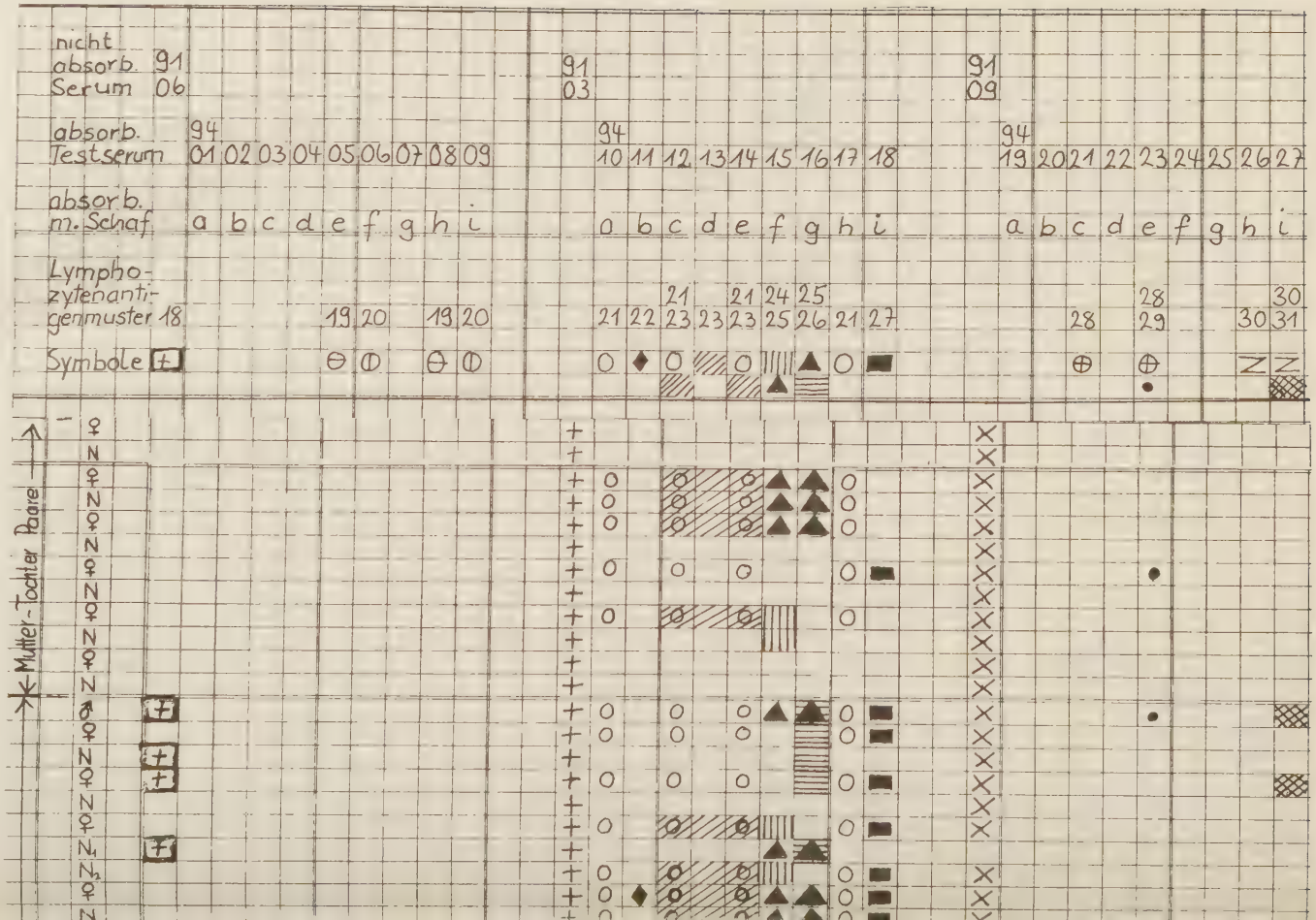
Tabelle 3. Beispiele der Fraktionierung von Immunseren.

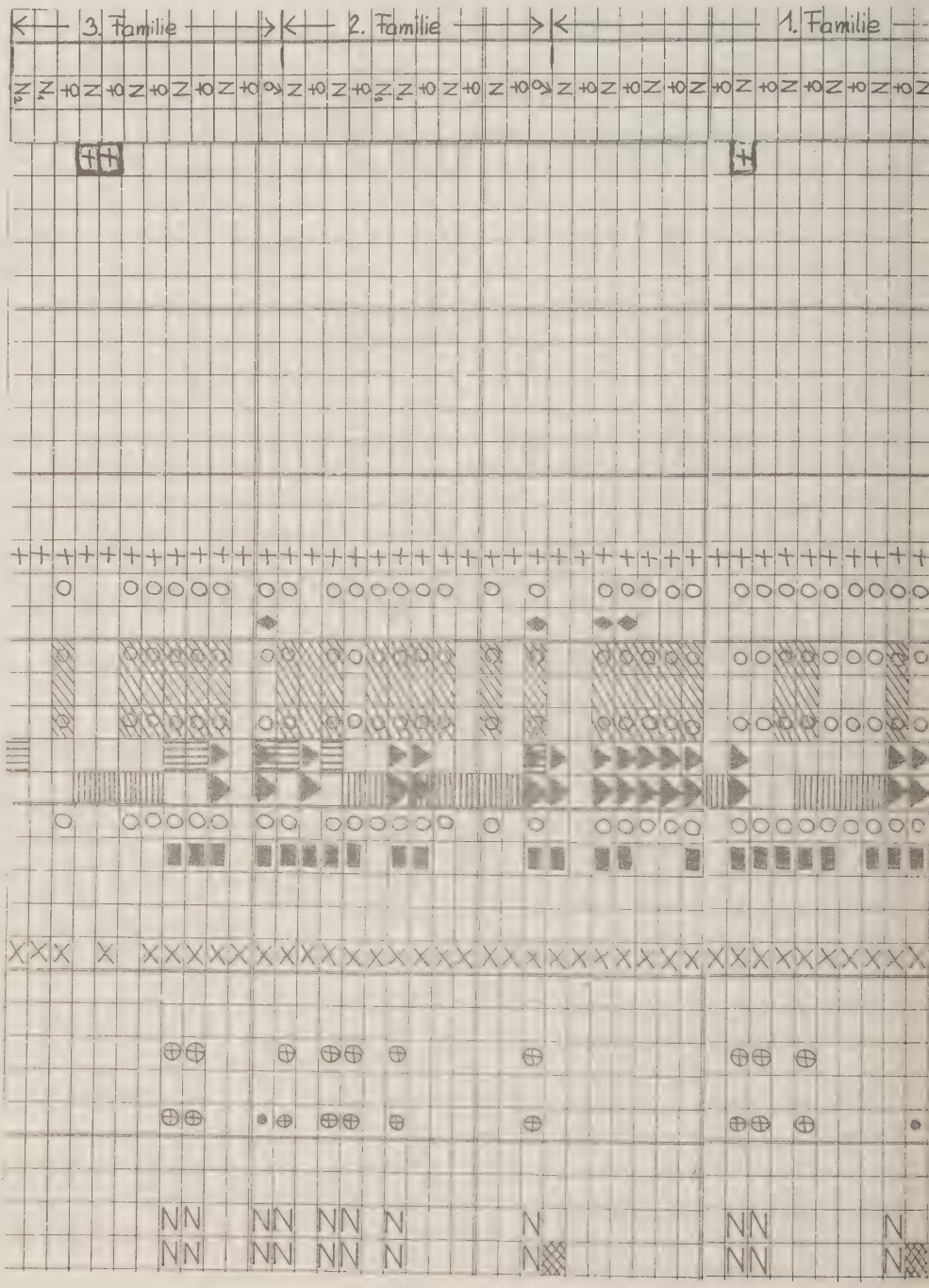
Zeichenerklärung: ♂ = Bock, ♀ = Muttertier, N = Nachkomme

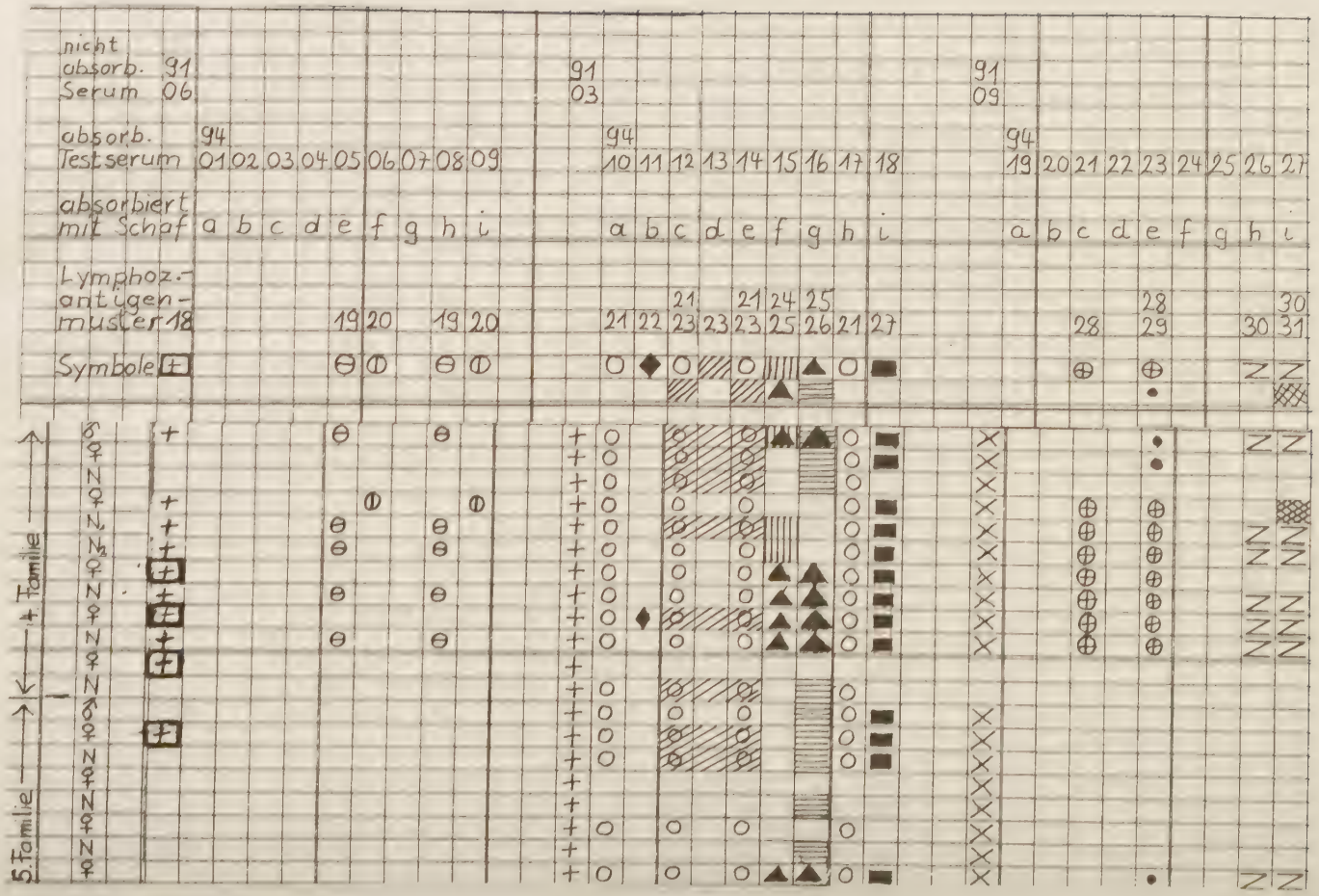



nicht verwandte Schafe

Fortsetzung Tabelle 3




3. Familie
2. Familie
1. Familie


nicht absorb. Serum
absorb. Testserum
absorbiert mit Schaf
Lymphoz.-antigen-muster
Symbole
4. Familie
5. Familie

6. Tamile

Die nach diesen Immunisierungen gebildeten Antikörper wurden, dem Ziel dieser Arbeit gemäß, ausschließlich auf ihre Reaktionsfähigkeit gegenüber Lymphozytenantigenen untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß antilymphozytäre Antikörper nicht nur durch Immunisierung mit Lymphozyten, sondern auch durch Immunisierung mit Granulozyten und Thrombozyten hergestellt werden können. Es sind daher auf allen zur Immunisierung verwendeten Zellen gemeinsame Antigene vorhanden. Eine Aussage über die Anzahl der Antigene an den verschiedenen Zellarten ist aufgrund der Immunisierungsergebnisse nicht möglich. Eine derartige Aussage ist schon allein wegen der genetischen Heterogenität des Tiermaterials nicht möglich.

Zur Herstellung von Antilymphozytenseren wurden in erster Linie Mütter mit den Zellen ihrer Nachkommen immunisiert. Es sollte damit von vornherein erreicht werden, daß das Spektrum der gebildeten Antikörper begrenzt ist. Die zu erwartenden Antikörper konnten bei Verwendung von Mutter-Tochter-Paaren nur von Antigenen aus dem väterlichen Erbgut stimuliert sein. Die Tatsache, daß von einem Spender drei verschiedene Zellarten zur Verfügung standen, machte es erforderlich, daß für die Immunisierung darüber hinaus nahe verwandte Tiere herangezogen wurden. In diesen Fällen war ein breiteres Antikörperspektrum als bei den Mutter-Tochter-Paaren zu erwarten. Dies hat sich in den Immunisierungsergebnissen bestätigt.

Die Immunisierungen wurden bezüglich Applikationsweg, Immunisierungsrhythmus und Immunisierungsdauer nach den Empfehlungen von SCHMID (1966) durchgeführt. Über eine optimale Antigendosis beim Schaf liegen in der Literatur keine Angaben vor. Die zur Immunisierung gewählten Zellzahlen führten zur Antikörperbildung. Bei einer Versuchsgruppe wurde die Immunisierungszeit auf drei Wochen, also auf die Hälfte, verkürzt. Dabei blieb die insgesamt applizierte Antigenmenge unverändert. Die Tiere wurden dreimal in wöchentlichen Abständen immunisiert. Damit hatte sich auch an dem Immunisierungsrhythmus nichts geändert. Obwohl die Antikörpertiter nach der verkürzten Immunisierung etwas höher lagen als nach der sechsmaligen Immunisierung, kann daraus nicht abgeleitet werden, daß es bei sechsmaliger Immunisierung bereits zu einem Titerabfall kommt. Andererseits ergibt sich aber daraus, daß zur Gewinnung von Immunseren mit ausreichendem Titer die Immunisierungszeit auf die Hälfte verkürzt und damit die Immunisierungsmethode entscheidend rationalisiert werden kann. Die Bedeutung einer Boosterung zur Erzielung höherer Antikörpertiter wurde bestätigt.

Nachdem erwiesen ist, daß dem Agglutinationstest beim Nachweis von Lymphozytenantigenen infolge mangelnder Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nur eine begrenzte Aussagekraft zukommt, wurde nach einigen Voruntersuchungen, die diese Erfahrungen bestätigten, in dieser Arbeit auf eine weitere Anwendung verzichtet.

Die Methode der Wahl zum Nachweis von Lymphozytenantigenen ist der Zytotoxizitätstest. Makro- und Mikrotest beruhen auf demselben Prinzip. Der Vorteil der Mikromethode liegt darin, daß mit wesentlich geringeren Serummengen gearbeitet werden kann, was besonders beim Einsatz von absorbierten Seren unerläßlich ist. Im Gegensatz zu Lymphozytenantigenen ist ein Nachweis von Granulozytenantigenen beim Schaf zur Zeit im Zytotoxizitätstest noch nicht möglich. Es hat sich gezeigt, daß die Granulozyten des Schafes nach ihrer Isolierung aus dem peripheren Blut in einem großen Prozentsatz membrangeschädigt und damit für den Farbausschlußtest ungeeignet waren. Da die Antigenität der Granulozyten nicht an eine intakte Zellmembran gebunden ist, können solche Granulozytenpräparationen aber für die Immunisierung verwendet werden. Die Feststellung, daß beim Schaf keine Unterschiede in den Antigenen der Blutlymphozyten und Lymphknotenlymphozyten vorlagen findet ihre Bestätigung durch die Untersuchungsergebnisse von NAEIM, STODDARD, SMITH u. WALFORD (1974) an menschlichen Blutlymphozyten und isolierten Lymphozyten aus Lymphknoten.

Zur Fraktionierung der Immunseren durch Absorption wurde eine begrenzte Anzahl von Immunseren ausgewählt. Diese Auswahl erfolgte aufgrund der Anzahl und der unterschiedlichen Reaktionsmuster der in verschiedenem Grade polyvalenten Immunseren. Beim Vergleich der Reaktionsmuster nicht absorbierter und absorbierter Immunseren zeigte sich, daß durch die Absorption bestimmte Antikörperpopulationen eliminiert worden waren

und dadurch die Fraktionierung von Antikörperpopulationen erfolgt war. Die drei ausgewählten Beispiele einer Fraktionierung von Immunseren (Tabelle 3) zeigen Reaktionsmuster unterschiedlicher Komplexität. Serum 9109 ist ein Beispiel für den Immunisierungserfolg nach Immunisierung der Mutter mit den Lymphozyten ihrer Tochter. Dieses Serum weist nach Absorption nur eine geringe Anzahl von Antikörperpopulationen auf. Demgegenüber ist das Serum 9103, das durch Immunisierung von Tieren mit entfernterem Verwandtschaftsgrad gewonnen wurde, in seiner Antikörperstruktur wesentlich komplexer. Als drittes Beispiel wurde ein Serum gewählt, dessen Antikörper nicht gegen die Donorlymphozyten gerichtet waren. Es handelt sich daher um sogenannte natürliche Antikörper, die möglicherweise von einer Immunisierung durch eine frühere Trächtigkeit stammen. Im einzelnen enthält das Serum 9109 mindestens fünf verschiedene Antikörperpopulationen. Absorptionen mit den Lymphozyten der Schafe a, b, d, f und g haben alle Antikörperpopulationen aus dem Immunserum entfernt. Die Absorption mit Lymphozyten des Schafes c ergab ein monovalentes Antilymphozytenserum (9109/c) zum Nachweis des Lymphozytenantigens 28. Nach Absorption mit Lymphozyten des Schafes e wurde ein bivalenter Antikörper (9109/e) zum Nachweis der Antigene 28 und 29 isoliert. Eine Differenzierung zwischen den Antigenen 28 und 29 ist nur bei Einsatz beider absorbierter Seren 9109/c und 9109/e möglich. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei den absorbierten Seren 9109/h und 9109/i. Im Serum 9109/h ist ein monovalenter Antikörper der Spezifität 30 und

im Serum 9109/i ein bivalenter Antikörper zum Nachweis der Lymphozytenantigene 30 und 31 enthalten. Das nicht absorbierte Serum 9109 enthält aufgrund der Absorptionsergebnisse mindestens eine weitere Antikörperpopulation, die jedoch serologisch nicht identifizierbar ist. Eine Analyse des polyvalenten Immunserums 9103 zeigte, daß in diesem Serum wenigstens acht verschiedene Antikörperpopulationen zum Nachweis der korrespondierenden Lymphozytenantigene enthalten sind. Besonders bemerkenswert dabei ist, daß die Absorptionen 9103/a und 9103/h das gleiche Antigen 21 markieren. Die Antikörperspezifität 21 befindet sich außerdem in den absorbierten Seren 9103/c und 9103/e. Monovalente Testseren für die Antigene 21 sind die Seren 9103/a und 9103/h, für das Antigen 22 das Serum 9103/b, für das Antigen 23 das Serum 9103/d und für das Antigen 27 das Serum 9103/i. Die Antigene 24 und 26 lassen sich nur bei gleichzeitigem Einsatz der Seren 9103/f und 9103/g unterscheiden. Das nicht absorbierte Serum 9103 enthält außerdem mindestens noch eine weitere Antikörperpopulation.

Im Serum 9106 wurden wenigstens drei verschiedene natürliche Antikörper zum Nachweis von Lymphozytenantigenen gefunden. Die Antigenanalyse erfolgte bei diesem Serum nach den gleichen Gesichtspunkten wie bei den nach experimenteller Immunisierung gewonnenen Immunseren. An diesem Beispiel soll gezeigt werden, daß auch natürliche Antikörper, die möglicherweise durch Immunisierung während einer früheren Trächtigkeit gebildet worden waren, sich fraktionieren

lassen. Die Reaktionsmuster sind verhältnismäßig einfach und gestatten die Differenzierung der Antigene 18, 19 und 20. Die Lymphozytenantigene 19 und 20 sind jeweils nach Absorption mit zwei verschiedenen Tieren erfaßbar, das Antigen 19 durch die Seren 9106/e und 9106/h und das Antigen 20 durch die Seren 9106/f und 9106/i. Die Antikörperspezifität 18 ergibt sich durch Ausschluß. Beim Einsatz natürlicher Antikörper ergibt sich neben der Frage der Spezifität immer auch die Frage, ob das antikörperhaltige Serum auch schwache Merkmalsträger erfaßt. Die Tatsache, daß möglicherweise nicht alle Merkmalsträger erfaßbar werden, macht die ganze Problematik des Einsatzes derartiger Seren deutlich.

Die Bezeichnung "monovalentes Serum" hat in den Lymphozytenserologie ganz allgemein begrenzte Aussagekraft, da im Augenblick weder beim Menschen noch beim Tier serologisch in ihrer Monovalenz gesicherte Testseren zur Verfügung stehen. Um dies klarzustellen spricht man daher besser von "operationally" monovalenten Seren. Das bedeutet jedoch, daß diese Seren in besonderem Maße für eine Lymphozytentypisierung geeignet sind. Die Lymphozytenantigene beim Schaf sind ähnlich wie die Erythrozytenantigene und die genetisch determinierten Serumprotein- und Enzympolymorphismen wichtige Chromosomenmarker. Mit Hilfe dieser Lymphozytenmarker ist es möglich, die Ausschlußchancen im Abstammungsgutachten zu erhöhen.

Mit der Isolierung von einer ganzen Reihe verschiedener Lymphozytenantigenen beim Schaf sind auch die Grundlagen für eine Erforschung von Zusammenhängen zwischen Immunitätsgenen

(Ir-Genen) und den Genen, die die Lymphozytenantigene kontrollieren, geschaffen. Darüber hinaus sind die Lymphozytenantigene beim Schaf als Marker für die Histokompatibilität in der experimentellen Chirurgie bedeutungsvoll. In diesem Zusammenhang muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß die in dieser Arbeit beschriebenen antilymphozytären Isoimmunseren durch Immunisierung mit Lymphozyten und nicht durch Haut- bzw. Organtransplantation gewonnen worden sind. Damit kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob oder welche dieser Antikörper Histokompatibilitätsantigene des Schafes erfassen.

6. Zusammenfassung

Durch Isoimmunisierung von Schafen mit Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten wurden Antikörper zum Nachweis von Lymphozytenantigenen bei Schafen gewonnen.

Nach Fraktionierung dieser Seren durch Absorptionen wurden 31 verschiedene Lymphozytenantigene nachgewiesen und ihre Phänotypfrequenzen beim Merino-Landschaf ermittelt.

Untersuchungen an Schaffamilien haben ergeben, daß die festgestellten Lymphozytenantigene genetisch determiniert sind und einem autosomalen kodominanten Erbgang folgen.

Daraus ergibt sich die Bedeutung der Lymphozytenmarker für die Sicherung bzw. Klärung der Abstammung beim Schaf, für die Immunitäts- und Resistenzforschung und die Transplantationsimmunologie.

Summary

Reagents containing anti-lymphocyte iso-antibodies were obtained through immunization of sheep with lymphocytes, granulocytes and platelets.

Absorption procedures permitted a fractionation of anti-lymphocyte antibody populations present in those reagents, and allowed to identify 31 different cell-bound antigens on lymphocytes of the Merino sheep. The phenotype frequencies for the Merino Landrace could be established.

Studies an sheep families confirmed that the identified lymphocyte associated antigens are genetically determined and follow an autosomal codominant trait.

Lymphocyte antigens are, in addition to red cell antigens, useful markers to solve parentage cases in sheep. The importance of lymphocyte antigens in immunity- and resistance research, as well as in experimental organ grafting has been pointed out.

7. Literaturverzeichnis

Albert, E.D. (1973):
Die genetischen Systeme der menschlichen Histokompatibilität: Das HL-A-System.
Blut 27, 73 - 80

Amos, D. (1966):
Cytotoxicity testing, histocompatibility testing.
Munksgaard, Copenhagen.

Balner, H., B.W. Gabb, E.K. Toth, H. Dersjant, W. van Vreeswijk: (1973):
The Histocompatibility Complex of Rhesus Monkeys. I. Serology and Genetics of RhL-A System.
Tissue Antigens 3, 257 - 272.

Begemann, H., H.G. Harwerth (1974):
Praktische Hämatologie. 6. Aufl.
G. Thieme Verlag, Stuttgart.

Begemann, H., J. Rastetter (1972):
Atlas der klinischen Hämatologie.
J. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Bøyum, A. (1964):
Separation of white blood cells.
Nature 21, 793 - 794.

Bøyum, A. (1974):
Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes.
Tissue Antigens 4, 269 - 274.

Carstairs, K (1962):
The human small lymphocyte. Its possible pluripotential quality.
Lancet I, 829 - 832.

Cassen, B., J. Hilt, E.F. Hays (1958):
The effecient separation of lymphocytes from normal human blood.
J. Lab. clin. Med. 52, 778 - 783.

Dacie, J.V., S.M. Lewis (1968):
Practical Haematology. 4. Ed.
Churchill, London.

Dain, A.R., J.G. Hall (1967):
A Method for the Isolation of White Cells from the Blood of Sheep by Differential Lysis with Hypotonic Saline Solutions.
Vox Sang. 13, 281 - 284.

Dausset, A.J. (1969):
Micro-Lymphocytotoxicity Techniques.
Manual of Tissue typing techniques.
Inst. of Health Bethesda, Maryland/USA, p. 43.

Dorf, M.E., E.K. Toth, H. Balner (1972):
Cross-reactions of HL-A Antibodies.
V. Relationship between the Human HL-A 11
and Chimpanzee ChW-11 Specifities.
Tissue Antigens 2, 461 - 472.

Elves, M.W. (1966):
The lymphocytes.
Lloyd Luke Ltd., London.

Engelfriet, C.P., A. Britten: (1965):
The Cytotoxic Test for Leucocyte Antibodies.
Vox Sang. 10, 660 - 674.

Engelfriet, C.P., Ch. van der Weerdt, C.E. Veenhofen (1969):
Development of monospecific lymphocyte antisera.
Manual of Tissue typing techniques,
National Inst. of Health, Bethesda, Maryland/USA,
p. 13.

Fallon, H., E. Frei, J.D. Davidson, J.S. Trier, D. Burk
(1962):
Leucocyte preparations from human blood: Evaluation of their morphologic and metabolic state.
J. Lab. clin. Med. 59, 779 - 791.

Fichtelius, K. (1951/1952):
A simple method to separate lymphocytes from blood.
Acta Soc. med. Upsala 56, 28 - 31.

Fortezza, B.G. (1964):
Atlas of blood cytology, cytomorphology, cytochemistry and cytogenetics.
Grune & Stratton, New York - London.

Gowans, I.L. (1974):
Lymphozyten.
Vortrag, gehalten am 14. 3. 1974 anläßlich der Paul-Ehrlich-Preis-Verleihung in Frankfurt/Main.

Green, I. (1974):
Genetic control of immune responses.
Immunogenetics 1, 4 - 21.

Hadley, G., N.L. Larson (1953):
Use of Sequestrene as an anticoagulant.
Amer. J. clin. Path. 23, 613 - 618

Harris, R., E.O. Ukaejiofo (1970):
Tissue typing using one step lymphocyte separation procedure.
Brit. J. Haemat. 18, 229 - 235.

Hauswaldt, Ch., U. Schröder (1973):
Fehlermöglichkeiten bei der Differenzierung von Blutausstrichen aus EDTA-Blut.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 79, 336 - 369

Heilmeyer, L., H. Begemann (1955):
Atlas der klinischen Hämatologie und Zytologie.
J. Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg.

Heilmeyer, L., A. Hittmair (1957):
Handbuch der gesamten Hämatologie.
1. Band: Allgemeine Hämatologie.
Verlag Urban & Schwarzenberg, München - Berlin - Wien.

Iha, T. H., G. Gerbrandt, W.F. Bodmer, D. McGary, W.H. Stone (1973):
Cross-Reactions of Cattle Lymphocytotoxic Sera with HL-A and other Human Antigens.
Tissue Antigens 3, 291 - 302.

Johnson, T.M., J.E. Garvin (1959):
Separation of lymphocytes in human blood by means of glass wool column.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 102, 333 - 335.

Kellner, O. (1953):
Eine neue Methode zur Anreicherung von Leukozyten aus kleinen Blutmengen.
Mikroskopie 8, 320.

Kissmeyer-Nielsen, F., K.E. Kjerbye (1967):
Lymphocytotoxic Micro-technique
Purification of Lymphocytes by Flotation.
In: Histocompatibility Testing, pp. 381 - 383.
Munksgaard, Copenhagen.

Klein, I. (1974):
The present concept of the major histo-
compatibility locus.
6. Tagung der Gesellschaft für Immunologie,
Hannover, 23. - 25. 9. 1974.

Lamvik, J.O. (1966):
Separation of lymphocytes from human blood.
Acta haematol. 35, 294 - 303.

Levine, S. (1956):
Magnetic techniques for in vitro isolation
of leucocytes.
Science 123, 185 - 186.

Manual of tissue typing techniques (1970):
Edit.: Brand, D.L. and J.G. Ray.
National Inst. of Health, Bethesda,
Maryland/USA.

Marsmann, A.W.J., M. van der Hart, J.J. van Loghem (1970):
Antigenetic differences between macrophages and lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 6, 899 - 903

Mengel, C.E., E. Frei, R. Nachman (1972):
Hematology - Principles and Practice.
Year Book Medical Publ. Inc., Chicago.

Miller, I.F. (1974):
Der Thymus in der Immunität.
Vortrag, gehalten am 14. 3. 1974 anläßlich der Paul-Ehrlich-Preis-Verleihung in Frankfurt/Main.

Millot, P. (1971):
Serologie. - Détermination d'antigénes lymphocytaires chez les ovins.
C. R. Acad. Sc. (Paris) 273, 2028 - 2030.

Millot, P. (1972):
Lymphocyte antigen groups in sheep.
13th European Conference on Animal Blood Group and Biochemical Polymorphism.
Wien, 26. 6. - 1. 7. 1972.

Mittal, K.K., P.I. Terasaki (1972):
Cross-Reactivity in the HL-A System.
Tissue Antigens 2, 94 - 104.

Naeim, F., A. Stoddard, G.S. Smith, R.L. Walford (1974):
HL-A antigens on cells isolated from malignant and nonmalignant lymph nodes.
Tissue Antigens 4, 166 - 171.

Norberg, N. (1970):
Statistical Analysis of the Radial Segmentation of Lymphocyte and Monocyte Nuclei in vitro.
Blut 21, 295 - 300.

Norberg, N., R. Uddman (1973):
The Oxalate-induced Radial Segmentation of the Nuclei of Lymphocytes and Monocytes from peripheral Blood.
Blut, 26, 261 - 267.

Nowell, D.C. (1960):
Phytohemagglutinine: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.
Cancer Res. 20, 462.

Otto, F. (1970):
Granulozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere.
Blut 21, 290 - 294.

Otto, F., D.O. Schmid (1970):
Lymphozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere.
Blut, 21, 118 - 122.

Pedersen, B., E.G.J. Hayhoe (1971):
Relation between Phagocytic Activity and Alkaline Phosphatase Content of Neutrophils in chronic Myeloid Leukaemia.
Brit. J. Haemat. 21, 257 - 260.

Rabinowitz, Y. (1964):
Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns including tissue culture observations.
Blood 23, 811 - 828.

Rogentine, G.N. (1969):
^{51}Cr-Release cytotoxicity Technique.
Manual of tissue typing techniques, p. 21.
National Inst. of Health, Bethesda, Maryland/USA.

Scheunert, A., A. Trautmann (1965):
Lehrbuch der Veterinärphysiologie.
Paul Parey Verlag, Berlin - Hamburg.

Schmid, D.O. (1961):
Über Isolierung von blutgruppenspezifischen Antigenen aus dem Stroma von roten Blutkörperchen des Rindes.
Z. Immun.-Forsch. exp. Ther. 121, 211 - 216.

Schmid, D.O. (1966):
Erforschung der Blutgruppen von Rind, Pferd und Huhn.
Habilitationsschrift, Universität München 1966.

Schmid, D.O. (1971):
Über Blutgruppen bei Schafen.
Zbl. Vet. Med. 18, 430 - 440.

Schmid, D.O. (1972):
New Aspects of Sheep Blood Groups.
Proc. XIIth European Conference of Animal Blood Groups,
Biochem. Polymorph., Budapest, pp. 561 - 566.

Schmid, D.O. S. Cwik (1975): R-receptors an lymphocytes of sheep.
Animal Blood Groups.
Biochem. Genet. (in Vorbereitung)

Schmid, D.O., S. Cwik, J. Förschner (1975):
Über Lymphozytenantigene beim Schaf.
Zbl. Vet. Med. B (im Druck).

Schmid, D.O., F. Otto (1971):
Zur Serologie der Granulozytenantigene
beim Schwein.
Zbl. Vet. Med. B 18, 205 - 210.

Schmid, D.O., F. Otto, S. Cwik (1972):
Über Lymphozyten- und Granulozytenantigene
beim Schwein.
Beitr. gerichtl. Med. 29, 170 - 174.

Schröder, U. (1973):
Veränderungen der Leukozyten-Morphologie
und -Verteilung im aus EDTA-Blut angefertigten
Differentialblutbild.
Inaugural-Dissertation 1973, Göttingen.

Simon, M., V. Hruban (1971):
Lymphocyte typing in pigs: evidence for
antigen L1.
Anim. Blood Grps biochem. Genet. 2, 95 - 100.

Sirchia, G., M. Scalamogna, C. Pizzi, F. Mercuriali (1973):
Lymphocyte isolation and Treatment with AET
for Routine Use in the Lymphocytotoxicity Test.
Tissue Antigens 3, 136 - 139.

Søderstrøm, N. (1966):
Fine needle aspiration biopsy used as a direct
adjunet in clinical diagnostic work, p. 43.
Grune & Stratton, New York.

Terasaki, P.I., J.A. Cannon, W.P. Longmire (1959):
Antibody response to homografts.
I. Technic of lymphoagglutination and detection of lymphoagglutination upon spleen injection.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 102, 280 - 285.

Terasaki, P.I., J.D. McClelland (1964):
Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins.
Nature 204, 998 - 1000.

Thorsby, E., F. Kissmeyer-Nielsen (1969):
HL-A Antigens and Genes.
III. Production of HL-A Typing Antisera of Desired Specifity.
Vox Sang. 17, 102 - 111.

Tilz , G.P., S. Sailer, R. Heschl (1969):
Präparation und Aktivitätsbestimmung anti-lymphozytärer Seren.
Med. Klin. 64, 1191 - 1195.

Troup, G.M., R.L. Walford (1969):
Cytotoxicity Test for the Typing of Human Lymphocytes.
Amer. J. clin. Path. 51, 529 - 534.

Uhlenbruck, G. (1971):
Immunbiologie.
W. Goldmann Verlag, München.

Vaiman, M. (1974):
Le complexe d'histocompatibilité majeur SL-A du porc.
1st World Congr. on Genetics applied to Livestock Produktion, Madrid 7.- 11. 10. 1974.

Vaiman, M., H. Garnier, A. Kunlin, J.M. Hay, R. Parc, F. Bacour, P. Fagniez, P.A. Villiers, J. Lecointre, M.F. Bara, P. Nizza (1972):
The SL-A histocompatibility system in the Sus scrofa species.
Transplantation 14, 541 - 550.

Vaiman, M., J. Haag, A. Arnoux, P. Nizza (1973):
The histocompatibility complex SL-A in the pig. Possible recombination between the regions governing MLR and serology respectively.
Tissue Antigens 3, 204 - 211.

Vaiman, M., C. Renard, J. Lafage, J. Ameteau, P. Nizza (1970):
Evidence for a histocompatibility system in swine.
Transplantation 10, 155.

Vallee, B.L., W.L. Hughes, J.G. Gibson (1947):
A method for the separation of leucocytes from whole blood by flotating on serum albumin.
Blood (special issue) No 1, 82 - 87.

Viza, D., J.R. Sugar, R.M. Binns (1970):
Lymphocyte stimulation in pigs: Evidence for the existence of a single major histocompatibility locus PL-A.
Nature 227, 949 - 950.

Walford, R.L. (1969):
Cytotoxicity Test.
Manual of Tissue typing techniques, pp. 28 - 31.
National Inst. of Health, Bethesda, Maryland/USA.

Walford, R.L., R. Gallagher, G. M. Troup (1965):
Human lymphocyte typing with isologous antisera: technical considerations and a preliminary study of the cytotoxic reactions system.
Transplantation 3, 387 - 401.

Wintrobe, M.M. (1965):
Clinical hematology. 6. Aufl.
Lea and Febiger, Philadelphia.

Herrn Professor Dr. Dr.h.c. A. Mayr danke ich herzlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung in München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. O. Schmid für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Blutgruppeninstituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, besonders Herrn Tierarzt S. Cwik, danke ich für die liebenswürdige Hilfe und wertvolle Diskussionen.

Lebenslauf

Mein Name ist Jörg Förschner.
Ich wurde am 16. September 1946 in Möttingen als Sohn von Otto Förschner und dessen Ehefrau Katharina Förschner, geb. Bergdold geboren.

Im Jahre 1953 trat ich in die Volksschule in Möttingen ein. Nach vier Jahren wechselte ich auf das humanistische Gymnasium in Nördlingen über, wo ich im Juli 1966 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1967 immatrikulierte ich mich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Am 18. Oktober 1972 bestand ich das Staatsexamen und am 12. Februar 1973 erhielt ich meine Bestallungsurkunde.

Seit November 1972 war ich bis Januar 1974 im Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt. Seit Januar 1974 bin ich als praktischer Tierarzt tätig.